

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WABLAT, Wolfgang
 Potsdamer Chaussee 48
 D-14129 Berlin
 ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 01 October 2001 (01.10.01)	
Applicant's or agent's file reference GES-15 559 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/DE00/00528	International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address MAGFORCE APPLICATIONS GMBH c/o CBN, Haus 30 Spandauer Damm 130 14050 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

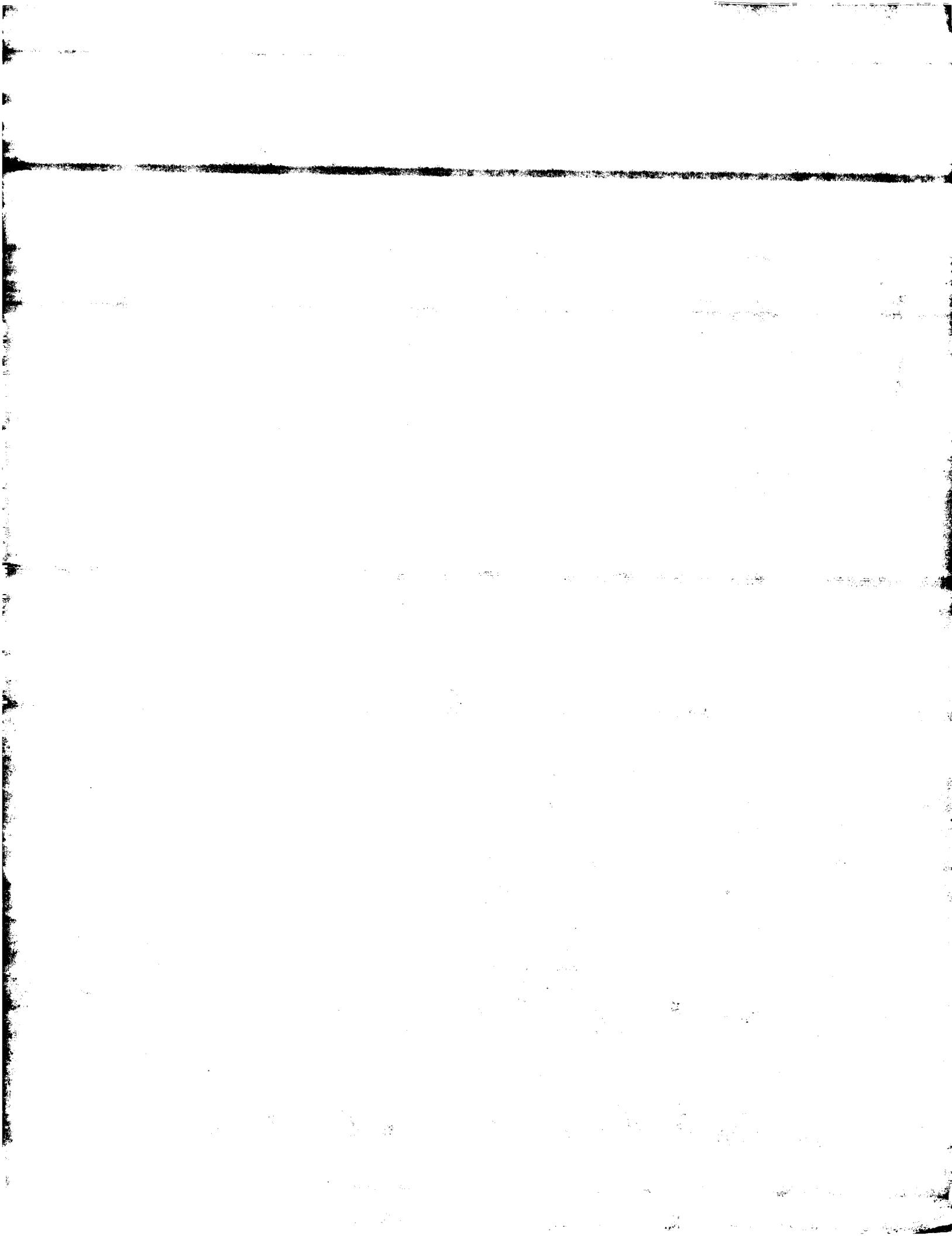
3. Further observations, if necessary:

Following an assignment, the applicant in Box (2) has been recorded as applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Ellen MOYSE
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WABLAT, Wolfgang
Potsdamer Chaussee 48
D-14129 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 01 October 2001 (01.10.01)	
Applicant's or agent's file reference GES-15 559 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/DE00/00528	International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)

1. The following indications appeared on record concerning:				
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent	<input type="checkbox"/> the common representative	
Name and Address JORDAN, Andreas Dahlemer Weg 63 A D-14167 Berlin Germany		State of Nationality		State of Residence
		DE		DE
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
Teleprinter No.				

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:				
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address	<input type="checkbox"/> the nationality	<input type="checkbox"/> the residence
Name and Address JORDAN, Andreas Dahlemer Weg 63 A D-14167 Berlin Germany		State of Nationality		State of Residence
		DE		DE
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
Teleprinter No.				

3. Further observations, if necessary: Following an assignment of rights, the above-mentioned applicant/inventor is now recorded as applicant/inventor for the US only.				
---	--	--	--	--

4. A copy of this notification has been sent to:				
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/>	the designated Offices concerned		
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	the elected Offices concerned		
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/>	other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Ellen MOYSE Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 24 October 2000 (24.10.00)	
International application No. PCT/DE00/00528	Applicant's or agent's file reference GES-15 559 WO
International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)	Priority date (day/month/year) 10 March 1999 (10.03.99)
Applicant JORDAN, Andreas	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 September 2000 (18.09.00)

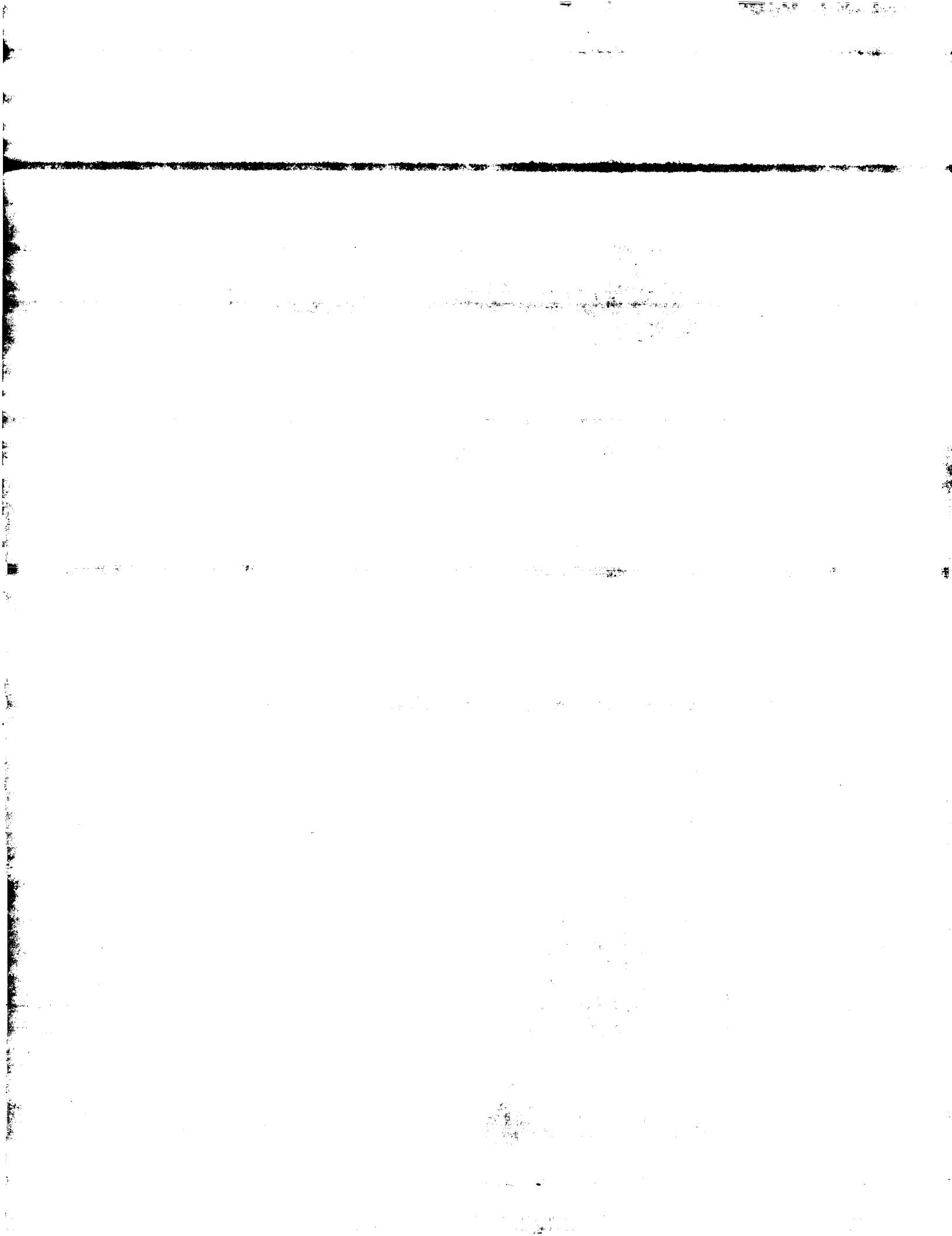
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Antonia Muller
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PCT

WORLD ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53728
C12N 5/08, C12M 3/04, G01N 1/06		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE00/00528	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CN, JP, KR, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	18. Februar 2000 (18.02.00)	
(30) Prioritätsdaten:		Veröffentlicht
199 12 798.0	10. März 1999 (10.03.99)	DE <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder:	JORDAN, Andreas [DE/DE]; Dahlemer Weg 63 A, D-14167 Berlin (DE).	
(74) Anwalt:	WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).	

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING CANCER CELLS FROM HUMAN TISSUE AND DEVICE FOR PREPARING TISSUE SAMPLES

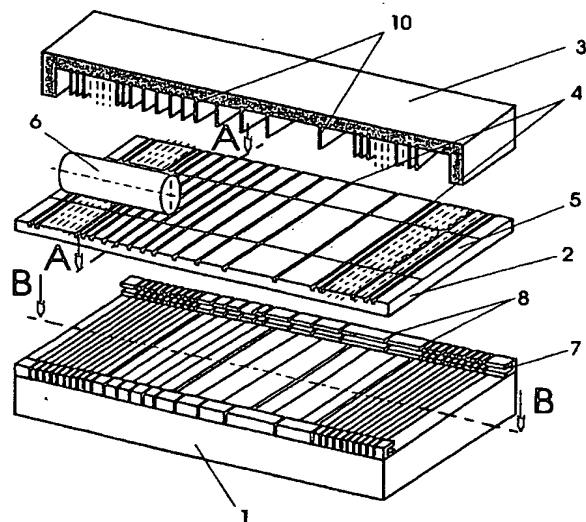
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON KREBSZELLEN AUS HUMANGEWEBE UND VORRICHTUNG ZUR AUFBEREITUNG VON GEWEBEPROBEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for cultivating cancer cells for scientific serial assays, wherein a tissue sample which is heterogeneous with respect to contaminants, normal cells and tumor cells is locally separated in a sequential-parallel splitting method. The locally separated sample segments are further split, wherein the tissue fragments and liquids of the tissue segments are separately placed in a given cell culture medium and grown under predetermined culture conditions. The invention also relates to a cell culture medium and a device for splitting the tissue samples into disc segments. The inventive method combined with the splitting device and the culture medium enables fast cultivation of cancer cells obtained from human tissue with a multiplication rate of 100 % in all types of tumors.

(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen für naturwissenschaftliche Reihenuntersuchungen wird eine in bezug auf Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang örtlich aufgelöst. Die ortsaufgelösten Probensegmente werden weiter geteilt, wobei die Gewebefragmente und -flüssigkeiten der Gewebesegmente separat in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen zum Wachstum gebracht werden. Es werden ein Zellkulturmedium sowie eine Vorrichtung zum Teilen der Gewebeprobe in Scheibensegmente angegeben. Mit dem Verfahren wird in Verbindung mit der Schneidvorrichtung und dem Kulturmedium bei allen Tumorarten eine schnelle Kultivierung von aus Humangewebe gewonnenen Krebszellen mit einer Angehrenrate von 100 % erreicht.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Beschreibung**Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe und Vorrichtung zur Aufbereitung von Gewebeproben**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für naturwissenschaftliche, vorzugsweise molekularbiologische und zellbiologische Reihenuntersuchungen sowie ein Zellkulturmedium zur Durchführung des Verfahrens und eine Vorrichtung zur Aufarbeitung der Gewebeproben.

Für molekularbiologische Untersuchungen, vor allem mit prädiktiver Intention, ist die Kultur von primären, aus Feinnadel- und Stanzbiopsien gewonnenem Zellmaterial von zentraler Bedeutung. Bei den bekannten Methoden ist jedoch die „Angehrate“ der aus Humangewebe isolierten Zellen sehr gering. Bei manchen Tumorarten ist eine Zellkultivierung bisher nicht gelungen. Diese Problematik ist zum einen dadurch begründet, daß die das Tumorgewebe umgebenden Normalzellen und/oder die das Tumorgewebe infiltrierenden Bindegewebszellen als erste wachsen und so die Tumorzellen, die für die Untersuchungen gewonnen werden sollen, überwachsen und am Wachstum hindern. Eine erfolgreiche Kultivierung von Krebszellen wird darüber hinaus durch vielfältige Kontaminationen, insbesondere mit Bakterien oder Pilzen, verhindert.

Die bisher für die Kultivierung von Tumorzellen verwendeten Zellkulturmedien, wie RPMI 1640, Basal Medium Eagle, ISCOVE's, Medium 199, Leibovitz L-15. u.a., sind nicht in der Lage, das Wachstum der Krebszellen in ausreichendem

Maße zu fördern bzw. das der Normalzellen und bakteriel-
len Kontaminanten zu verhindern. Der bisher übliche un-
kontrollierte Einsatz von Antibiotika wirkt zwar den ne-
gativen Einflüssen der Kontaminanten entgegen, behindert
5 aber gleichzeitig das Wachstum der Tumorzellen.

Bei den bekannten Verfahren zur Kultivierung von Krebs-
zellen erfolgt die Aufbereitung der aus Feinnadel- oder
10 Stanzbiopsien gewonnenen Gewebeproben durch eine mecha-
nisch-enzymatische Gewebe-Disaggregation, bei der der he-
terogene, aus verschiedenen Schichten bestehende, die Ge-
webeprobe bildende Stanzyylinder durch eine Feinzerklei-
nerung als Ganzes in eine breiige Masse zerteilt und mit
15 Hilfe von Enzymen in einzelne Zellen umgewandelt werden
soll. Durch diese Feinzerkleinerung wird aber die hetero-
gene Struktur der entnommenen Gewebeprobe zerstört und es
erfolgt eine intensive Vermischung der Tumorzellen mit
den Normalzellen und Kontaminanten. Zum einen wird die
20 Vitalität der Tumorzellen durch die Feinzerkleinerung be-
einträchtigt. Andererseits ist durch die Zerstörung der
Heterogenität der Gewebeprobe der Probematerialbrei mit
Normalzellen und Kontaminanten durchsetzt, so daß das
Wachstum der Tumorzellen aus den oben genannten Gründen
25 vermindert oder sogar vollständig verhindert wird. Bei
dieser Art der mechanisch-enzymatischen Gewebe-
Desaggregation des Gesamtmaterials sind Aussagen über die
Struktur des Tumors nicht möglich.

30 Bei den bisher bekannten Verfahren zur Vermehrung und
Reinigung des aus einer Gewebeprobe gewonnenen Tumormate-
rials wird die Zellvermehrung durch Transplantation des
Tumormaterials auf eine Nacktmaus vorgenommen (Xeno-
35 Transplantat). Bei diesem Verfahren können zwar Angehра-
ten des transplantierten Tumorgewebes von 50 % und gele-

gentlich auch mehr erreicht werden, jedoch vergehen - je nach Tumorart und Eigenschaften - mehrere Wochen oder gar Monate, ehe sich eine Zellvermehrung *in vivo* einstellt. Aufgrund des erheblichen Aufwands und der Zeitdauer haben Routinetests mit patientenindividuellen Primärzellen für eine Verlaufskontrolle und prädiktive Zwecke bisher nicht Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Aufgrund der langwierigen und oftmals vergeblichen Versuche zur Kultivierung des vom Patienten entnommenen Gewebematerials liegen die Testergebnisse viel zu spät vor, um in einem Routineverfahren aus den Versuchsergebnissen eine rechtzeitige Änderung des Therapieregimes vornehmen zu können. Neben dem hohen Zeitaufwand ist auch die erforderliche Durchführung von Tierversuchen und der hohe Kostenaufwand nachteilig.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein von Tierversuchen unabhängiges Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebeproben anzugeben, das in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum von wenigen Tagen eine sichere Vermehrung von Tumorzellen aus einer Gewebeprobe gewährleistet und reproduzierbare Aussagen über die Struktur und die Malignität des Tumors sowie Wachstums- und Strukturänderungen oder therapeutische Effekte zuläßt. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung einer auf dem Verfahren beruhenden Vorrichtung zur reproduzierbaren Aufbereitung von Gewebeproben sowie einem geeigneten Zellkulturmedium zur Vermehrung von Krebszellen *in vitro*.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs I gelöst.

Der Grundgedanke der Erfindung besteht dabei darin, daß die Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang in eine Mehrzahl separater Gewebesegmente aufgeteilt wird und somit die auf der Grundlage von Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe bzw. deren Heterogenität örtlich aufgelöst wird. Die Gewebesegmente werden dann jeweils separat weiter zerkleinert und die so gebildeten kleinen, separierten Gewebefragmente und -flüssigkeiten sowie die bei der sequentiell-parallelen Teilung der Gewebeprobe entstandene, ebenfalls jeweils separat gewonnene Gewebeflüssigkeit werden in einem spezifischen Zellkulturmedium und unter ausgewählten Kulturbedingungen kultiviert. Durch die örtliche Auflösung der Gewebeprobe werden die Einflüsse von in dieser vorhandenen Normalzellen, die bei üblicher - mechanischer oder enzymatischer - Aufbereitung der Gewebeprobe ein Überwachsen der Tumorzellen bewirken, ausgeschaltet oder zurückgedrängt. Gleichermassen wird das Ausmaß von Kontaminationen, wie Pilze oder Bakterien, wesentlich reduziert bzw. erforderliche Antibiotika, die die Vermehrung von Tumorzellen bekanntmaßen stören, können sparsam und gezielt eingesetzt werden, ohne sich auf die Krebszellenkultivierung negativ auszuwirken.

Das vorgeschlagene Verfahren wird in weiterer Ausbildung der Erfindung durch ein für sehr geringe Gewebemengen geeignetes Zellkulturmedium in der im Anspruch 8 wiedergegebenen Zusammensetzung sowie durch die im Anspruch 5 hinsichtlich der Sauerstoff- und Kohlendioxidatmosphäre, der Luftfeuchte und der Temperatur sowie der Verwendung einer Biomatrix dargelegten Kultivierungsbedingungen vorteilhaft ergänzt. Insgesamt werden somit Bedingungen geschaffen, unter denen das Wachstum der Krebszellen geför-

dert und das der Normalzellen und Kontaminanten wesentlich eingeschränkt oder sogar vollständig ausgeschaltet wird.

5

Weitere vorteilhafte Verfahrensmerkmale ergeben sich aus den Unteransprüchen. So wurde beispielsweise gefunden, daß die Tumorzellen in Anwesenheit von Erythrozyten, die unmittelbar von der Entnahmestelle der Gewebeprobe am Patienten stammen, besonders schnell wachsen und eine höhere „Angehrate“ besitzen als Zellen, die nur im reinem Zellkulturmedium zum Wachstum gebracht werden. Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Gewebeprobe mindestens 2 Stunden, aber nicht länger als 24 Stunden, bei etwa 4°C bis 12°C in einem Zellkulturmedium aufbewahrt wird, um bereits jetzt an das Zellkulturmedium, in dem später die Vermehrung der Krebszellen erfolgen soll, angepaßt zu werden. Unter den aufgeführten Verfahrensbedingungen ist eine Adhäsion der Tumorzellen aus den aufbereiteten Gewebefragmenten an einer Biomatrix in der Zellkulturflasche bereits nach 1 bis 12 Stunden zu verzeichnen, sofern eine dem Gewebeentnahmeart identische Kulturtemperatur eingestellt wird.

20

25

Mit der vorliegenden und weiter unten in einem Ausführungsbeispiel detailliert beschriebenen Erfindung wird somit ein Verfahren zur Vermehrung von Tumorzellen in vitro angegeben, mit dem in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum bei allen Tumorarten eine Kultivierung von aus Huminangewebe gewonnenen Zellen mit einer „Angehrate“ von 100 % gelingt. Gegenüber der auf der Nacktmaus (Xeno-Transplantat) erzielten Zellvermehrung, bei der Angehraten von etwa 50 % erzielt werden, werden nicht nur Tierversuche vermieden und Kosten gespart, sondern es ist auch eine drastische Verkürzung der für die Vermehrung

30

35

des Zellmaterials benötigten Zeit zu verzeichnen, die gegenüber einem Zeitraum von mehreren Wochen oder gar Monaten beim Tumorwachstum *in vivo* bei dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Verfahren in der Regel bei lediglich 1 - 5 10 Tagen liegt.

Dadurch ist es erstmals möglich, Routineuntersuchungen für die Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen und für prädiktive Zwecke (Sensibilitätstest mit Strahlen, Chemotherapie, Hyperthermie) oder zur Früherkennung von Resistenzen zur Identifikation neuer Antikrebswirkstoffe, als Ergänzung für zytologische oder histopathologische Gewebebefunde und in der Grundlagenforschung auf einfache und 10 reproduzierbare Weise schnell und kostengünstig durchzuführen.
15

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist zur erfindungsgemäß ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe als entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche 20 Zellvermehrung eine Vorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 9 vorgesehen. Diese Vorrichtung besteht zum einen aus einem Schneidapparat zum sequentiell-parallelen 25 Teilen der Gewebeprobe und zum anderen aus einem Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufarbeitung der mit dem Schneidapparat hergestellten Gewebesegmente. Bei den in diesen Vorrichtungen durchgeführten Schneidvorgängen werden die jeweiligen Gewebestücke und -flüssigkeiten, die von verschiedenen Stellen der heterogenen Gewebeprobe 30 stammen, voneinander getrennt in der Vorrichtung gehalten und können somit selektiv für die Zellvermehrung eingesetzt werden.

Der Schneidapparat umfaßt im wesentlichen eine in Kammern eingeteilte Auffangschale mit einer auf dieser beweglich angebrachten Schneidplatte sowie einen Schneidmesserrahmen. In der Schneidplatte in vorgegebenen Abständen ausgebildete Schneidrinnen, die im Schneidbereich zur Auffangschale hin offen sind, liegen jeweils oberhalb einer Kammer. Im Schneidmesserrahmen sind Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht, der mit dem zwischen den Schneidrinnen übereinstimmt. Durch das Schneiden der auf der Schneidplatte liegenden Gewebeprobe jeweils im Bereich einer Schneidrinne wird ein sauberes Abtrennen der Gewebesegmente erreicht, und gleichzeitig gelangen Reststücke und Gewebeflüssigkeit in die unterhalb der Schneidrinne liegende Kammer.

15

Zur weiteren Aufbereitung der Gewebesegmente ist ein Zerkleinerungsgerät vorgesehen, das aus einer in Kammern geteilten Flüssigkeits-Auffangschale, einer auf dieser lösbar angebrachten Aufbereitungsplatte mit Vertiefungen zur Aufnahme der Gewebesegmente und einzelnen oder in einer Halteplatte drehbar und längsbeweglich angeordneten Drehstempeln mit an deren Stirnseite befestigten Messern besteht. Mit diesem Gerät werden die zur Zellvermehrung letztlich eingesetzten kleinen Gewebefragmente erzeugt. Die gleichfalls verwendbare, bei dem Schneidvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit gelangt über in den Vertiefungen ausgebildete Löcher in die jeweils darunterliegende Kammer in der Flüssigkeits-Auffangschale und wird ebenfalls zur Zellvermehrung verwendet.

Weitere Merkmale und vorteilhafte Weiterbildungen der erfundungsgemäßen Vorrichtung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen.

35

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend beschrieben, wobei hinsichtlich der Zellvermehrung in vitro auf die beigelegte Tabelle, in der die Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums wiedergegeben ist, und hinsichtlich der Aufarbeitung der Gewebeproben auf die beigelegte Zeichnung Bezug genommen wird. In der Zeichnung zeigen:

10

Fig. 1

eine auseinandergezogene perspektivische Ansicht einer Schneidvorrichtung zur erfindungsgemäßen sequentiell-parallelen Aufbereitung einer Gewebeprobe;

15

Fig. 2

eine auseinandergezogene perspektivische Darstellung einer Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der in der Vorrichtung nach Fig. 1 hergestellten Gewebesegmente für die Zellvermehrung in vitro;

20 Fig. 3

eine Schnittansicht einer Auffangschale längs der Linie B-B in Fig. 1;

25

Fig. 4

einen senkrechten Schnitt durch eine Schneidplatte im Bereich einer Schneidrinne längs der Linie A-A in Figur 1; und

30

Fig. 5

eine Querschnittsansicht der Vorrichtung nach Fig. 2 in zusammengebautem Zustand.

35

Die vom Patienten in Form einer Feinnadel-bzw. Stanz-Biopsie entnommene Gewebeprobe liegt als Gewebestanzzy-linder vor, kann aber auch ein nach anderen Verfahren ge-wonnenes kleines Gewebefragment oder ein Gewebestück un-5 terschiedlicher Form und Größe sein. Die Gewebeprobe mit den an dieser haftenden, von der Entnahmestelle der Probe am Patienten stammenden Erythrozyten wird für den Trans-port zum Untersuchungsort in einem Zellkulturmedium bei Temperaturen zwischen 2°C und 12°C aufbewahrt, und zwar 10 für einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden, maximal je-doch 24 Stunden. In diesem Zeitraum werden mechanische Belastungen des Gewebestücks vermieden. Das Gewebestück kann sich dabei bereits an das auch zur Zellvermehrung später benutzte Zellkulturmedium mit gleicher Zusam-15 mentsetzung anpassen, wobei die oben angegebenen Temperaturen besonders günstig sind.

20 Die Aufarbeitung der Gewebeprobe für die Zellkultivierung erfolgt mit den in der Zeichnung dargestellten Vorrich-tungen.

25 Die Vorrichtung zum sequentiell-parallelen Teilen der Ge-webeprobe in Abschnitte von bestimmter, vorgegebener Län-ge und zum Separieren dieser Abschnitte bzw. von Bestand-teilen derselben umfaßt eine Auffangschale 1, eine auf der Auffangschale 1 gehaltene Schneidplatte 2 und einen Schneidmesserrahmen 3. Die Schneidplatte 2 ist in fünf 30 Abschnitte gleicher Breite eingeteilt. In jedem Abschnitt befinden sich jeweils in unterschiedlichem Abstand ange-ordnete Schneidrinnen 4, die in ihrem mittleren Bereich zur Auffangsschale 1 hin offen sind. Die Schneidrinnen 4 sind in den fünf Abschnitten jeweils im Abstand von 1 mm, 35 2 mm, 3 mm, 5 mm und 1 mm angeordnet. In Längsrichtung der Schneidplatte ist in deren mittlerem Bereich eine

aufgerauhte Auflagefläche 5 ausgebildet, um die darauf liegende Gewebeprobe 6 bei einem Schneidvorgang zu fixieren. In diesem Bereich sind die Schneidrinnen 4 nach unten offen. Die Schneidplatte 2 ist in zwei an den Längsseiten der Auffangschale 1 angebrachten Führungsschienen 7 verschiebbar gehalten. Die Schneidrinnen 4 in der Schneidplatte 2 setzen sich in Einschnitten 8 in den Führungsschienen fort.

10

Die Auffangschale 1 ist entsprechend den in der Schneidplatte 2 vorgesehenen Rinnenabschnitten durch Trennwände 12 in fünf Kammern 1a - 1e geteilt, wobei den Schneidrinnen durch weitere Zwischenwände in den betreffenden Kammern 1a, 1b, 1c und 1e jeweils Unterkammern 1a1 bis 1a9, 1b1 bis 1b4, 1c1 bis 1c3 und 1e1 bis 1e9 zugeordnet sind. Die Unterkammern sind zur exakten örtlichen Zuordnung der einzelnen Gewebeprobesegmente 6a oder Gewebeprobenreste bzw. Gewebeflüssigkeit entsprechend unterschiedlich markiert.

Der Schneidmesserrahmen 3 besteht aus einem Deckel oder Halterrahmen mit an dessen Deckplatte befestigten Schneidmessern 10. Anstelle der Schneidmesser 10 können zwischen den Rahmenseiten auch Schneiddrähte gespannt sein. Die Schneidmesser 10 sind im gleichen Abstand wie die Schneidrinnen 4 in der Schneidplatte angeordnet. Der Schneidmesserrahmen 3 ist so dimensioniert bzw. die Schneidmesser 10 sind so angeordnet, daß die Schneidelemente über bzw. in den Schneidrinnen 4 und Einschnitten 8 hin- und herbewegt werden können. Der Schneidmesserrahmen 3 kann an einer Längsseite der Auffangschale 1 gelenkig befestigt sein, und zwar so, daß er in der auf der Schneidplatte 2 befindlichen Lage dennoch quer zur Gewe-

...

beprobe bewegt werden kann, um die Probe an den Schnittstellen sauber zu durchtrennen.

5 In Abhängigkeit von der Länge der Gewebeprobe und dem gewünschten Schnittabstand wird die Gewebeprobe 6 auf die aufgerauhte Auflage 5 der Schneidplatte 2 gelegt. Durch Hin- und Herbewegen des auf die Gewebeprobe gelegten (geklappten) Schneidmesserrahmens 3 wird das Präparat im
10 Bereich der Schneidrinnen 4 durchtrennt. Beim Schneiden entstehende Flüssigkeit fließt über die im Bereich der Auflagefläche 5 der Schneidplatte 2 in den Schneidrinnen 4 vorgesehenen Öffnungen 4a in die jeweils darunter liegende Unterkammer. Die aufgefangene Flüssigkeit kann
15 ebenso für die Zellvermehrung genutzt werden wie die abgetrennten Probensegmente, die entweder auf der Schneidplatte 2 liegenbleiben oder durch die Öffnung 4a in der Schneidrinne 4 in die darunterliegende Unterkammer fallen.

20

Mit der beschriebenen Vorrichtung gemäß den Figuren 1, 3 und 4 können in den vorgegebenen Abmessungen präzise und gleichmäßige sowie glatte Schnitte ohne Beschädigung des Probenmaterials reproduzierbar ausgeführt werden. Die Zellvermehrung erfolgt somit aus einer entsprechend der Heterogenität des dem Patienten entnommenen Gewebestücks durch die Segmentierung örtlich aufgelösten Gewebeprobe. Dadurch wird der störende Einfluß von Normalzellen und
25 Kontaminanten auf das Wachstum der Tumorzellen zurückgedrängt bzw. ausgeschaltet (Selektion). Außerdem kann auch die beim Schneiden der Gewebeprobe ortsaufgelöst entstehende Gewebeflüssigkeit, die wichtige Stammzellen enthält, für die Zellvermehrung genutzt werden. Im Ergebnis
30 der sich an die unten beschriebene weitere Aufbereitung der Gewebeprobe anschließenden Zellvermehrung *in vitro*
35

können Aussagen über die Struktur der heterogen ausgebildeten Gewebeprobe, über die Anordnung des Tumorkerns oder die Malignität getroffen werden. Schließlich ist die Herstellung der Probensegmente mit der jeweiligen Ortsauflösung auch reproduzierbar, so daß verlässliche Aussagen über den Verlauf der Erkrankung oder die Wirkung therapeutischer Maßnahmen getroffen werden können.

10 In einer Ausführungsvariante der oben beschriebenen Schneidvorrichtung kann das Durchtrennen der Gewebeprobe auch mit einem separaten Messerstempel (nicht dargestellt) erfolgen, an dem die Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht sind, der mit dem zwischen den Schneidrinnen 4 übereinstimmt.

20 In den Figuren 2 und 5 ist eine Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelöst zur Verfügung gestellten Probensegmente 6a oder von Reststücken wiedergegeben. Bei dieser Vorrichtung ist eine Flüssigkeits-Auffangschale 13 durch senkrechte Trennwände 11 in mehrere Kammern 13a bis 13e aufgeteilt. In zwei am oberen Rand der Flüssigkeits-Auffangschale 13 gegenüberliegend angebrachten Führungsschienen 14 ist eine Aufbereitungsplatte 15 mit in dieser im Abstand eingeförmten Vertiefungen 16 gehalten. Die Vertiefungen 16 weisen am Boden kleine Löcher 17 auf. In der in die Führungsschienen 14 vollständig eingeschobenen Lage der Aufbereitungsplatte 15 liegen die Vertiefungen 16 jeweils über einer Kammer 13a bis 13e. Die zuvor abgetrennten Probensegmente 6a der Gewebeprobe 6 werden in die Vertiefungen 16 gelegt und mit an einem Drehstempel 18 befestigten Drehstempelmesser 19 weiter zerkleinert. Vorzugsweise sind 2 oder mehrere Drehstempelmesser 19 an der Stirnseite des Drehstempels angeordnet. Das Zerkleinern der Probensegmente 6a erfolgt bei leichtem Druck und

gegebenenfalls gleichzeitigem Hin- und Herdrehen des Drehstempels 18.

5 Wie Fig. 2 zeigt, können auch mehrere Drehstempel 18 in einer Halteplatte 20 drehbeweglich und heb- und senkbar gehalten sein. Der Abstand zwischen den Drehstempeln 18 entspricht dem der Vertiefungen 16 in der Aufbereitungsplatte 15.

10

Nach der weiteren Teilung der Probensegmente 6a stehen deren Teilstücke (Gewebefragmente) und die bei diesem Trennvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit, die über die 15 Löcher 17 in den Vertiefungen 16 in die Kammern 13a bis 13e gelangt, für die Zellvermehrung zur Verfügung.

20 Die in den Figuren 1 bis 5 dargestellten Vorrichtungen zum ortsaufgelösten, sequentiell-parallelen Schneiden und weiteren Aufbereiten der Gewebeprobe bestehen aus einem bis 121°C beständigen, zur Behandlung im Autoklav geeigneten Material, vorzugsweise Teflon, Metall oder Plastik. Für die Schneidmesser wird vorzugsweise Glas verwendet.

25

Die einzelnen Teilstücke und die jeweilige Gewebeflüssigkeit der ortsaufgelöst hergestellten Probensegmente 6a werden nun separat in einzelne, mit dem gleichen Zellkul- 30 turmedium, in dem sich bereits die dem Patienten entnom- mene Gewebeprobe 6 befand, gefüllte Zellkulturflaschen eingebracht. Das verbleibende Zellkulturmedium, in dem die Gewebeprobe nach der Probenahme aufbewahrt wurde, wird ebenfalls in eine Zellkulturflasche gefüllt. Die 35 Zellkulturflaschen sind jeweils mit einer Biomatrix, hier Collagen oder Polylysin beschichtet. Die Zusammensetzung

des hier für die Zellvermehrung in vitro eingesetzten Zellkulturmediums ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

5 **Anorganische Salze**

	Ca (NO ₃) ₂	50 mg/L
	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	132 mg/L
	KCl	400 mg/L
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	150 mg/L
10	NaCl	6400 mg/L
	NaHCO ₃	2100 mg/L
	Na ₂ HPO ₄	400 mg/L

15 **Aminosäuren**

	L-Arginin • 4 HCl	110 mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	38 mg/L
	L-Asparaginsäure	23 mg/L
	L-Cystin	31 mg/L
20	L-Glutaminsäure	25 mg/L
	L-Glutamin	296 mg/L
	Glycin	13 mg/L
	L-Histidin (freie Base)	12 mg/L
	L-Hydroxyprolin	10 mg/L
25	L-Isoleucin	38 mg/L
	L-Leucin	38 mg/L
	L-Lysin • HCl	35 mg/L
	L-Methionin	12 mg/L
	L-Phenylalanin	16 mg/L
30	L-Prolin	22 mg/L
	L-Serin	26 mg/L
	L-Threonin	22 mg/L
	L-Tryptophan	5 mg/L
	L-Tyrosin	19 mg/L
35	L-Valin	22 mg/L
	L-Alanin	10 mg/L

Vitamine

	Biotin	0,6 mg/L
	D-Ca-Pantothenat	0,7 mg/L
5	Cholinchlorid	3,5 mg/L
	Folsäure	1,0 mg/L
	i-Inositol	35,9 mg/L
	Nicotinamid	1,0 mg/L
	Pyridoxal o HCl	1,0 mg/L
10	Riboflavin	20 µg/L
	Thiamin o HCl	1,0 mg/L
	Para-Aminobenzoësäure	500 µg/L
	Vitamin B ₁₂	5 µg/L
	Niacin	25 µg/L
15	Ascorbinsäure	50 µg/L
	Folinsäure	6 µg/L
	Liponsäure	21 µg/L
	Vitamin A (Acetat)	100 µg/L
	Pyridoxin o HCl	25 µg/L
20	Niacinamid	25 µg/L
	α-Tocopherolphosphat	10 µg/L

Weitere Komponenten

25	D-Glucose	1750 mg/L
	Phenolrot	7 mg/L
	Glutathion (reduziert)	0,5 mg/L
	Na-Pyrovat	1 mM
	Epidermaler Wachstumsfaktor	
30	(Epidermal Growth Factor, EGF-rekombinant)	250 ng/L
	Fötales Rinderserum (FBS)	12,5 %
	Insulin vom Rind (Lyophilisat)	8 mg/L (26 U/mg)
35	Antibiotika nach Stand der Technik.	

Die mit einer Biomatrix beschichteten Zellkulturflaschen mit dem erfindungsgemäßen Zellkulturmedium und den in diesem befindlichen, nach dem zuvor beschriebenen Aufbereitungsverfahren hergestellten kleinen Gewebefragmenten bzw. der Gewebeflüssigkeit werden anschließend in einen Brutschrank eingebracht und dort bei einer Temperatur zwischen 30°C und 36,5°C, einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 %, einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 bis 5 % und einer Luftfeuchte von 100 % aufbewahrt. Die genaue Temperatur richtet sich nach der Temperatur, die bei der Entnahme der Gewebeprobe gemessen wurde.

Bereits nach 1 bis 12 Stunden erfolgt eine Adhäsion der Tumorzellen an das Biomatrixsubstrat in der Zellkulturflasche. Etwa 24 Stunden nach der Erstetablierung der Kultur wird nach erfolgter Zelladhäsion das in den Zellkulturflaschen befindliche Medium gegen ein frisches Zellkulturmedium, das die gleiche Zusammensetzung wie das erste aufweist, ausgetauscht. Weitere Medienwechsel werden - je nach Präsenz von Kontaminanten - in der ersten Woche durchgeführt. Nachdem die Tumorzellen nach einer Ruhephase etabliert sind und sich vermehren, werden sie in einem von Antibiotika freien Medium gehalten. Daraufhin wird die Massenvermehrung initiiert.

Durch die oben beschriebene frühzeitige Teilung der Gewebeprobe nach 2 bis 24 Stunden in separate Gewebesegmente bzw. noch kleinere Gewebefragmente ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination und einer Massenvermehrung von Kontaminanten in den Kulturflaschen gering. Dennoch vereinzelt aufgefundene Kulturflaschen mit hoher Kontaminationsbelastung werden verworfen. Bei einer durch technische Fehler bedingten starken Vermehrung von Normalzel-

len, die zu einem Überwachsen der Tumorzellen führen,
kann auch eine Magnetseparation durchgeführt werden, wor-
aufhin unter den oben angegebenen Kulturbedingungen ein
selektives Wachstum der malignen Zellen gewährleistet
5 ist.

Bezugszeichenliste

5	1	Auffangschale
	1a1 bis 1a10	Unterkammern
	1b1 bis 1b5	Unterkammern
	1c1 bis 1c3	Unterkammern
	1d	
10	1e1 bis 1e10	Unterkammern
	2	Schneidplatte
	3	Schneidmesserrahmen
	4	Schneidrinnen
	4a	Öffnung in 4
15	5	Auflagefläche
	6	Gewebeprobe
	6a	Probensegment
	7	Führungsschiene
	8	Einschnitte
20	10	Schneidmesser/Schneiddrähte
	11	Trennwand
	12	Trennwand
	13	Flüssigkeitsauffangschale
	13a bis 13e	Kammern
25	14	Führungsschienen
	15	Aufbereitungsplatte
	16	Vertiefungen
	17	Löcher
	18	Drehstempel
30	19	Drehstempelmesser
	20	Drehstempel-Halteplatte

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Human-
gewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen,
dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe (6) auf
der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf
Tumorzellen, Normalzellen und Kontaminanten durch ei-
ne sequentiell-parallele Teilung in Scheibensegmente
örtlich aufgelöst wird und die einzelnen Gewebepro-
bensegmente separiert und weiter in Gewebefragmente
geteilt werden und die gewonnenen kleinen, separier-
ten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten der orts-
aufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in einem be-
stimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kultur-
bedingungen selektiv zum Wachstum gebracht werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und
intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe ge-
wonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe
haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnahme-
stelle der Probe an dem betreffenden Patienten vor-
übergehend in ein Zellkulturmedium eingebacht wird.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß das Zellkulturmedium zur zwischenzeitlichen Auf-
bewahrung der frischen Gewebeprobe mit dem Vermehrung
der Tumorzellen vorgesehenen Zellkulturmedium iden-
tisch ist.

20

4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.

5

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten (6a) erzeugten Gewebefragmente und -flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten Zellkulturfälschen unter einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 % und einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 - 5 % sowie bei einer Luftfeuchte von 100 % und Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.

10

15

20 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturfälsche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.

25

30 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, wie Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.

30

35 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium aus anorganischen Salzen, nämlich

21

	Ca (NO ₃) ₂	10-100	mg/L
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	80-150	mg/L
	KCl	200-1000	mg/L
5	MgSO ₄ • 7H ₂ O	200-700	mg/L
	NaCl	3000-10000	mg/L
	NaHCO ₃	1500-4000	mg/L
	Na ₂ HPO ₄	100-1000	mg/L;

10

Aminosäuren, nämlich

	L-Arginin • 4 HCl	10-500	mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	10-500	mg/L
15	L-Asparaginsäure	10-500	mg/L
	L-Cystin	10-500	mg/L
	L-Glutaminsäure	10-500	mg/L
	L-Glutamin	10-500	mg/L
	Glycin	10-500	mg/L
20	L-Histidin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Hydroxyprolin	10-500	mg/L
	L-Isoleucin	10-500	mg/L
	L-Leucin	10-500	mg/L
	L-Lysin • HCL	10-500	mg/L
25	L-Methionin	10-500	mg/L
	L-Phenylalanin	10-500	mg/L
	L-Prolin	10-500	mg/L
	L-Serin	10-500	mg/L
	L-Threonin	10-500	mg/L
30	L-Tryptophan	10-400	mg/L
	L-Tyrosin	10-500	mg/L
	L-Valin	10-500	mg/L
	L-Alanin	10-300	mg/L

35

Vitaminen, nämlich

22

	Biotin	0,01-10	mg/L
	D-Ca-Pantothenat	0,01-10	mg/L
	Cholinchlorid	0,1-50	mg/L
	Folsäure	0,01-10	mg/L
5	i-Inositol	0,1-100	mg/L
	Nicotinamid	0,01-10	mg/L
	Pyridoxal o HCL	0,01-10	mg/L
	Riboflavin	0,1-100	µg/L
	Thiamin o HCL	0,1-50	mg/L
10	Para-Aminobenzoesäure	1-1000	µg/L
	Vitamin B ₁₂	1-1000	µg/L
	Niacin	1-100	µg/L
	Ascorbinsäure	1-5000	µg/L
	Folinsäure	1-100	µg/L
15	Liponsäure	1-100	µg/L
	Vitamin A (Acetat)	10-1000	µg/L
	Pyridoxin o HCl	1-100	µg/L
	Niacinamid	1-100	µg/L
	α-Tocopherolphosphat	0-1000	µg/L

20

sowie

	D-Glucose	100-5000	mg/L
	Phenolrot	0,1-1000	mg/L
25	Glutathion (reduziert)	0,01-10	mg/L
	Na-Pyruvat	0,1-50	nM
	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF)		
	-rekombinant	1-3000	ng/L
30	Fötales Rinderserum (FBS)		
	Insulin vom Rind (Lyophilisat)	0,1-50	mg/L

und Antibiotika zusammengesetzt ist.

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (1a1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1e1 bis 1e10) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) übereinstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.

10

15

20

25

30

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete aufgerauhte Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

24

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.

5

10

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10) ist.

15

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.

20

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) verspannte Schneiddrähte bilden.

25

30

15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangsschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangschale (13) gehalten sind, wobei in den Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

35

25

16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar sowie drehbar angeordnet sind.

5

10

15

20

25

30

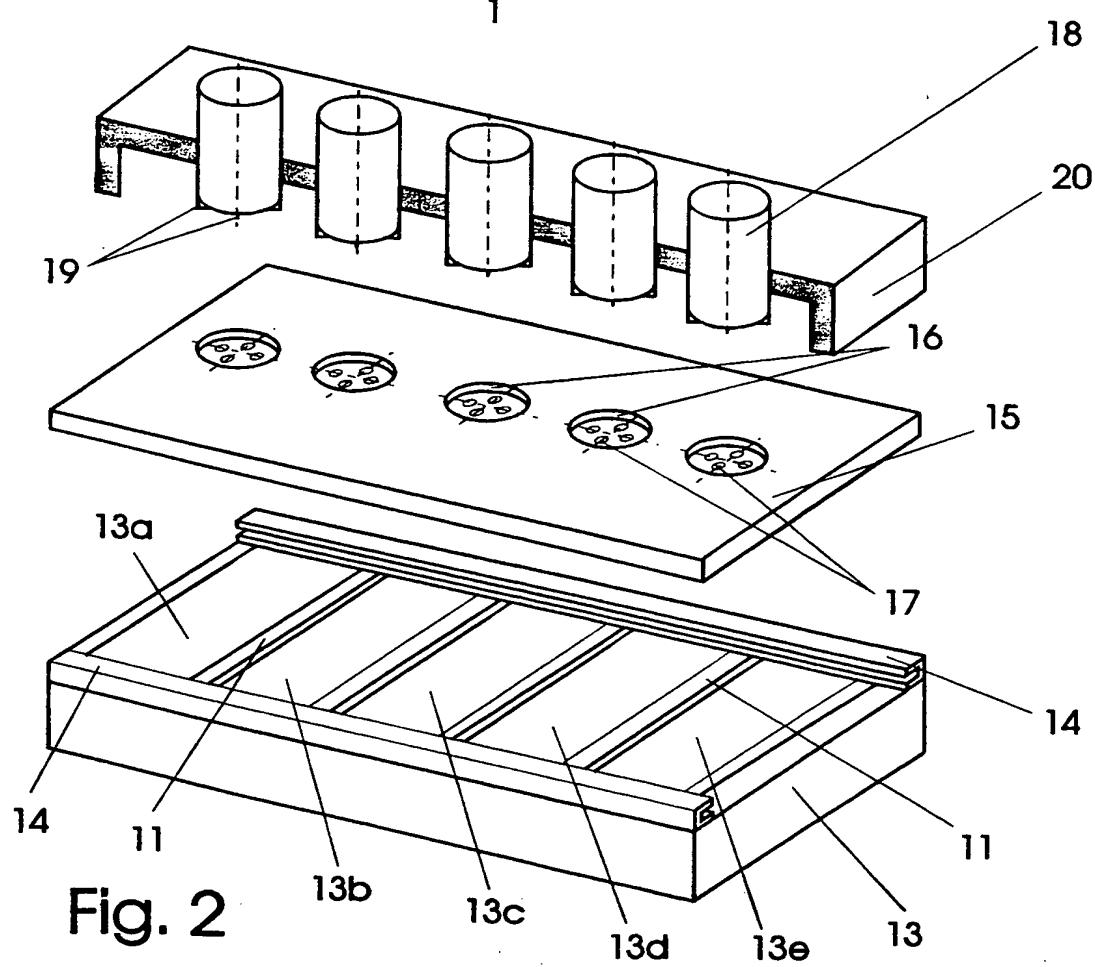
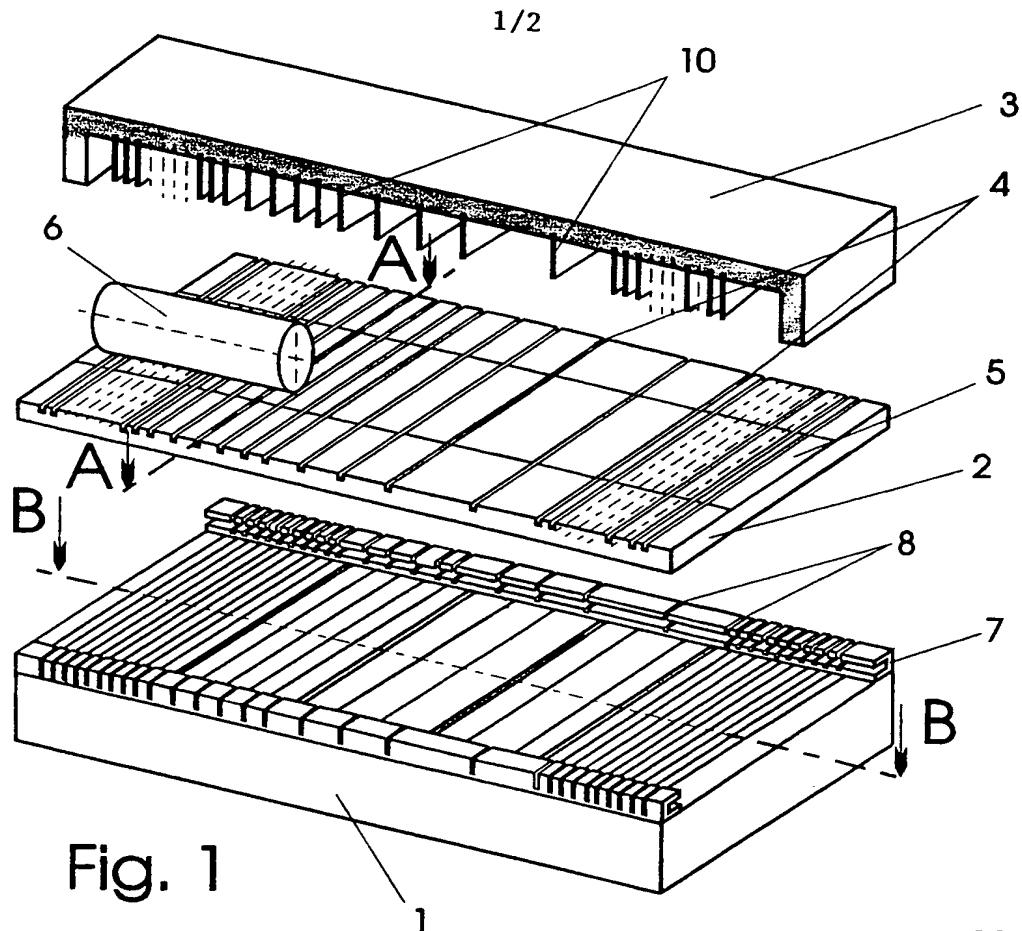
35

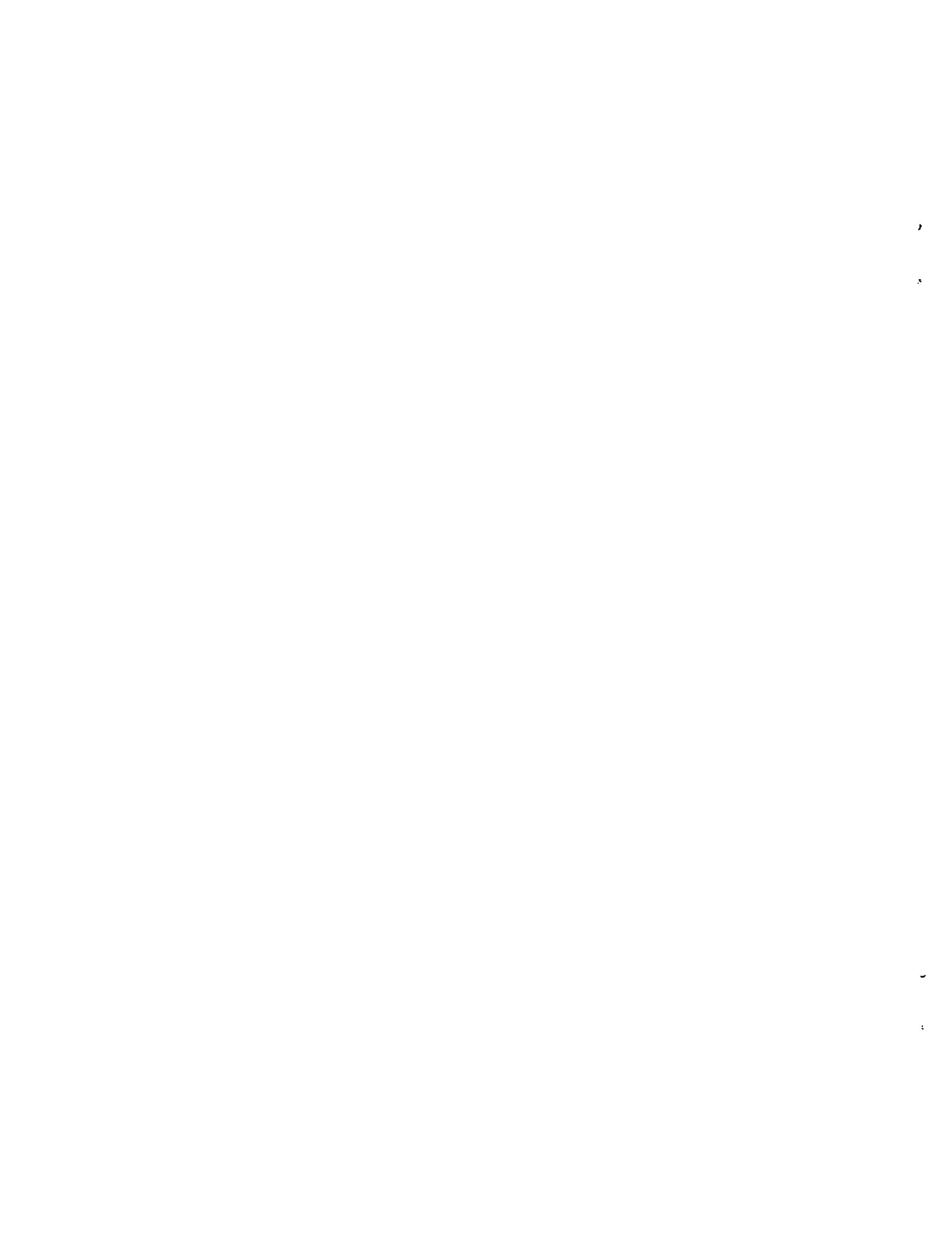
1

2

3

4





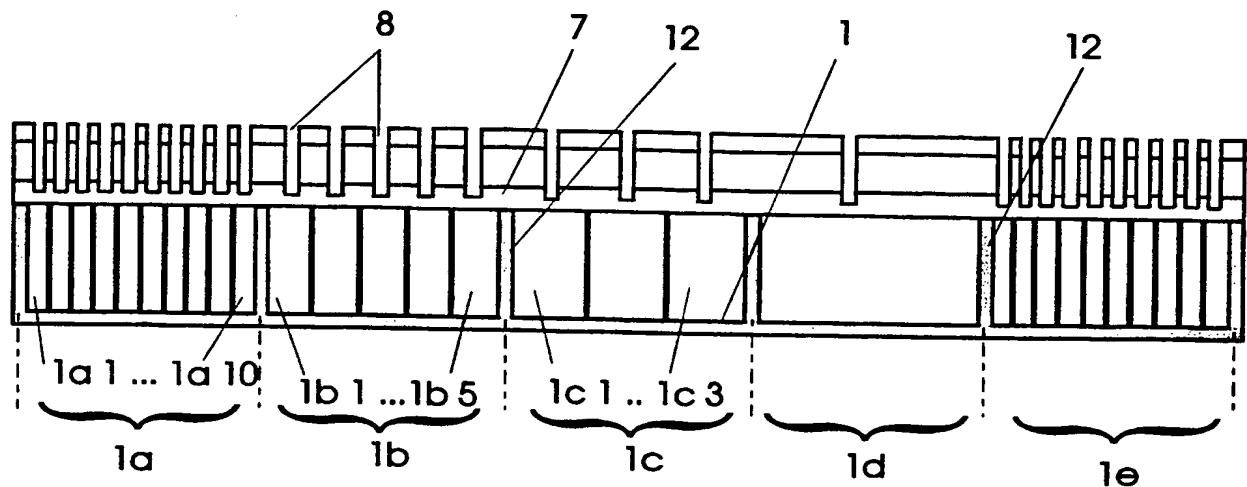


Fig. 3

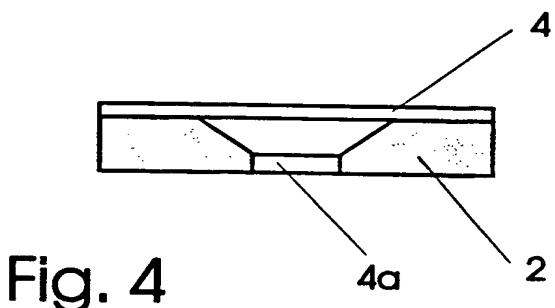


Fig. 4

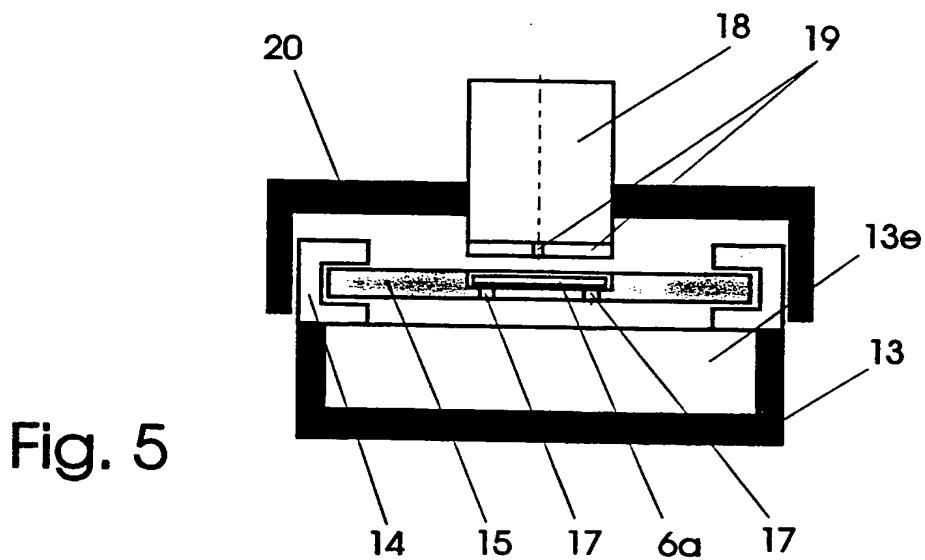


Fig. 5



1600
1214.00026
JC05 Rec'd PCT/PTO PATENT
27 FEB 2002

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:) 1645
ANDREAS JORDAN)
Corres. to PCT/DE00/00528) METHOD FOR CULTIVATING
Serial No. 09/914,662) CANCER CELLS FROM HUMAN
Filed August 31, 2001) TISSUE AND DEVICE FOR
) PREPARING TISSUE SAMPLES

TECH CENTER 1600/2900

APR 02 2002

RECEIVED

TRANSMITTAL LETTER

Box PCT
Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Enclosed in connection with the above case is an English translation of the International Preliminary Examination Report.

Respectfully submitted,

WOOD, PHILLIPS, VAN SANTEN,
CLARK & MORTIMER

By Jeffrey L. Clark
Jeffrey L. Clark
Reg. No. 29,141

February 7, 2002

500 West Madison Street
Suite 3800
Chicago, IL 60661-2511
(312) 876-1800

37 CFR 1.8
CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Box PCT, Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231, on February 7, 2002.

Signature: Karen Sanderson
Name: Karen Sanderson

RECEIVED

PCT INITIAL PROCESSING
MAR - 1 2002

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference GES-15 559 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/00528	International filing date (day/month/year) 18 February 2000 (18.02.00)	Priority date (day/month/year) 10 March 1999 (10.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/08		
Applicant	JORDAN, Andreas	

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>8</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 September 2000 (18.09.00)	Date of completion of this report 08 June 2001 (08.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/00528

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:^{*} the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19) _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

pages 1-16, filed with the letter of 02 March 2001 (02.03.2001)

 the drawings:

pages 1/2, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages 2/2, filed with the letter of 02 March 2001 (02.03.2001)

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig. _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/00528

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 8-16	YES
	Claims	2-7 (see Box VIII, item 2)	NO

2. Citations and explanations

The present claims can be acknowledged to be novel because the available prior art does not mention the sequential-parallel division of a tissue sample into disk-shaped segments. An inventive step also appears to be established because the available prior art does not propose dividing and at the same time separating the divided, that is to say broken-up, tissue fragments in order to prevent normal cells, which are also present, from overgrowing the tumour cells.

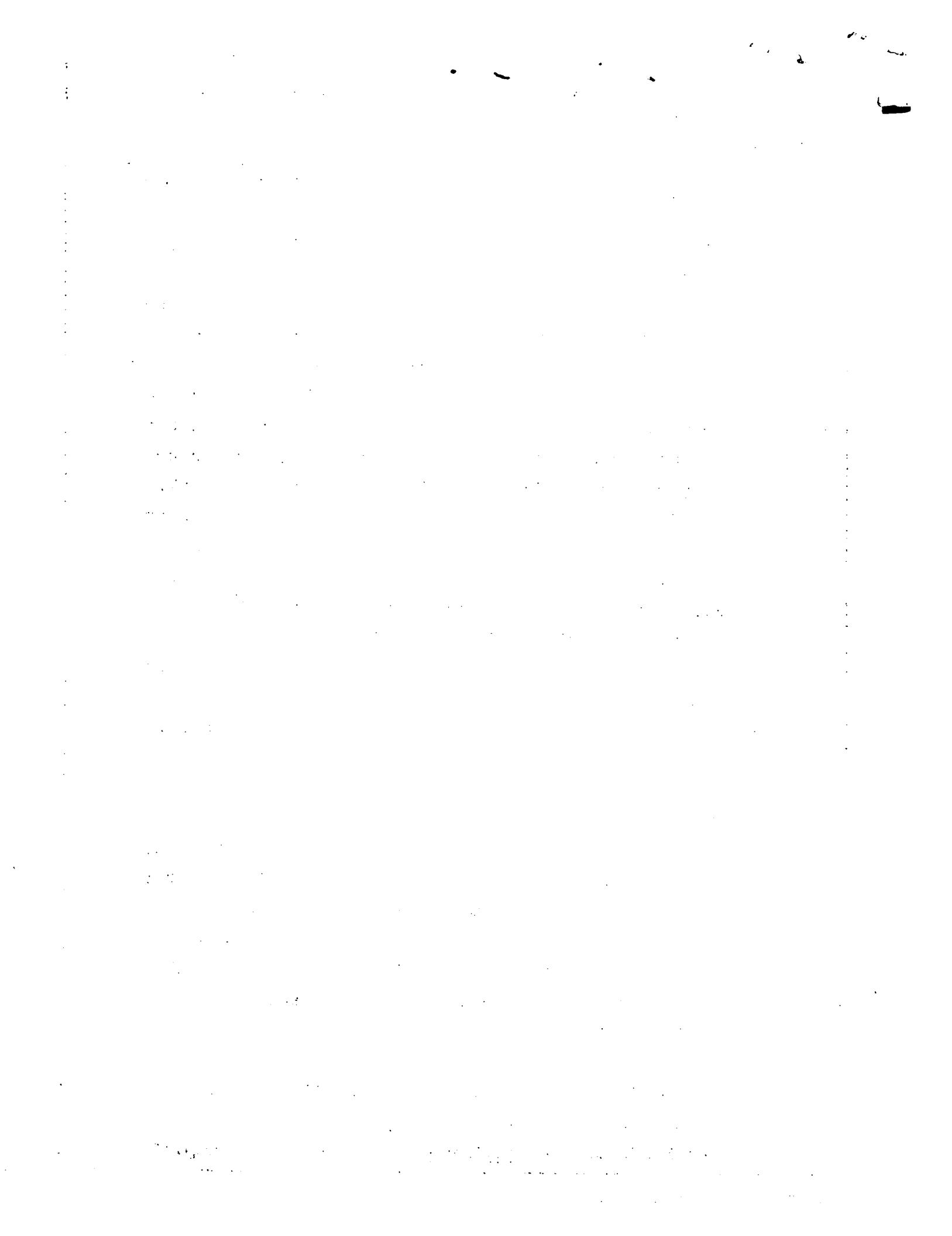
Consequently, the present Claims 1-7 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3). The same applies to claims 8-16, whose subject matter is also not described or suggested by the available prior art.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/DE 00/00528**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

No basis can be found in the original application documents for the amendments to the newly filed Claims 1 and 2.



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. According to the present description (see page 1, last paragraph), the cell culture media used until now in the prior art are not suitable for promoting the growth of cancer cells. Consequently, the use of the claimed cell culture medium (see page 13, last paragraph to page 15 of the application) appears to be necessary in order to successfully carry out the claimed method for cultivating cancer cells. In this respect, the applicant is invited to note that all the features that are essential for carrying out an invention must be defined in the independent claims. Moreover, the method parameters indicated on page 16, first paragraph, appear to be essential for carrying out the claimed method, that is for promoting the growth of cancer cells and suppressing the growth of normal cells and contaminants. Consequently, these features should also be included in the independent claims.
2. Claim 2, and hence also Claims 3-7, which refer back to Claim 2, concern a surgical method. Consequently, these claims concern a subject matter which, in the opinion of the Examiner, falls under PCT Rule 67.1(iv). As a result, no opinion is established with regard to the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).
3. The wording of Claim 1 is unclear: Claim 1 states that sequential-parallel separation is carried out, but leads to the breaking-up of the tissue sample?!



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/00528

VIII. Certain observations on the international application

Moreover, the expression "sequential-parallel" does not appear to be a standard technical term. This is also true of the expression "spatially resolved". Consequently, the use of these expressions leads to an objection for lack of clarity (PCT Article 6). It might be better to replace them by the expression "divided" ("aufgeteilt", in German) used on page 4 of the description.



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts GES-15 559 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 00528	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/02/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/03/1999
Anmelder JORDAN, Andreas		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erlaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

wie vom Anmelder vorgeschlagen

keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/00528

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 7 C12N5/08	C12M3/04	G01N1/06
--	----------------	----------	----------

C12N5/06

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	DE 199 12 798 C (JORDAN ANDREAS) 17. Februar 2000 (2000-02-17) das ganze Dokument ----	1-16
A	WO 97 23602 A (NESTLE SA ;BAUR MARKUS (CH); MACE CATHERINE (CH); MALNOE ARMAND (C) 3. Juli 1997 (1997-07-03) Seite 15, Zeile 8-31; Beispiel 6 ----	1,5-8 -/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28. November 2000

07/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00528

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	IMAGAWA W ET AL: "SERUM-FREE GROWTH OF NORMAL AND TUMOR MOUSE MAMMARY EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 79, Nr. 13, 1982, Seiten 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ----	1,5-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26. Dezember 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18. August 1995 (1995-08-18) Zusammenfassung ----	9,11
A	WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 ----	9,11
A	DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13. April 1995 (1995-04-13) Ansprüche 1,2; Abbildungen 1-3 ----	9
P,X	US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16. November 1999 (1999-11-16) Seite 5, Zeile 15 -Seite 6, Zeile 19 -----	1,5-8



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur gleichen Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00528

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19912798	C	17-02-2000	WO	0053728 A		14-09-2000
WO 9723602	A	03-07-1997	AU	1305497 A		17-07-1997
			BR	9612256 A		13-07-1999
			CZ	9801945 A		11-11-1998
			EP	0780469 A		25-06-1997
			EP	0877797 A		18-11-1998
			HU	9903742 A		28-03-2000
			JP	2000506374 T		30-05-2000
			NO	982810 A		21-08-1998
			PL	327320 A		07-12-1998
			SK	83598 A		11-01-1999
JP 07218398	A	18-08-1995		KEINE		
WO 9524464	A	14-09-1995	AU	687531 B		26-02-1998
			AU	2060195 A		25-09-1995
			CA	2162465 A		14-09-1995
			EP	0698085 A		28-02-1996
			IL	112944 A		18-02-1997
			JP	9501324 T		10-02-1997
			US	5512480 A		30-04-1996
DE 4334281	A	13-04-1995	AT	186478 T		15-11-1999
			DE	9321578 U		09-03-2000
			EP	0647475 A		12-04-1995
US 5985290	A	16-11-1999	US	6033674 A		07-03-2000
			US	6087174 A		11-07-2000



50c0
**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

09/914662
INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

7
 REC'D 12 JUN 2001
 PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts GES-15 559 WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 18/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 10/03/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C12N5/08

Anmelder

JORDAN, Andreas

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I Grundlage des Berichts
 - II Priorität
 - III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 18/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 08.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter SCHEFFZYK, I Tel. Nr. +49 89 2399 8602- 



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 02/03/2001 mit Schreiben vom 28/02/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/2 ursprüngliche Fassung

2/2 eingegangen am 02/03/2001 mit Schreiben vom 28/02/2001

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-16 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-16 Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1,8-16 Nein: Ansprüche 2-7: siehe Sektion VIII/2).

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00528

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



SEKTION V-----

Neuheit vorliegender Ansprüche kann anerkannt werden, denn eine sequentiell-parallele Teilung einer Gewebeprobe in Scheibensegmente wird im zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht erwähnt. Auch scheint das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit gegeben zu sein, denn eine Aufteilung und zugleich eine Separierung der aufgeteilten, d.h. aufgelösten, Gewebesegmente um ein Überwachsen der Tumorzellen von ebenfalls vorhandenen Normalzellen weitgehend zu vermeiden wird im zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht vorgeschlagen.

Demnach erfüllen vorliegende Ansprüche 1-7 die Erfordernisse des Art. 33(2)(3) PCT. Das gleiche gilt auch für Ansprüche 8-16, deren Gegenstand im zur Verfügung stehenden Stand der Technik auch nicht beschrieben oder nahegelegt wird.

SEKTION VI-----

DE-A-199 12 798

SEKTION VII-----

Für die in den neu-eingereichten Ansprüchen 1 und 2 durchgeföhrten Änderungen ist keine Basis in den ursprünglichen Anmeldungsunterlagen zu finden (Art. 34(2)(b) PCT).

SEKTION VIII-----

- 1). Gemäß vorliegender Beschreibung (siehe Seite 1, letzter Absatz) sind die im Stand der Technik bisher verwendeten Zellkulturmedien nicht geeignet das Wachstum der Kreszellen zu fördern. Demnach scheint die Verwendung des erfindungsgemäßen Zellkulturmediums (siehe Seite 13, letzter Absatz bis Seite 15 der Anmeldung) zur erfolgreichen Durchführung des beanspruchten Verfahrens zur Kultivierung von Krebszellen erforderlich zu sein. Diesbezüglich wird die

Anmelderin darauf hingewiesen, dass alle Merkmale, die zur Durchführung einer Erfindung wesentlich sind in den unabhängigen Ansprüchen definiert werden müssen. Des Weiteren scheinen die auf der Seite 16, erster Absatz angegebenen Verfahrensparameter zur Durchführung des beanspruchten Verfahrens, d.h. Wachstum der Krebszellen fördern und das der Normalzellen und Kontaminanten unterdrücken, wesentlich zu sein. Demnach sollten auch diese Merkmale in den unabhängigen Ansprüchen aufgeführt sein.

- 2). Anspruch 2 und demnach aufgrund des Rückbezugs zu Anspruch 2 auch Ansprüche 3-7 umfassen ein chirurgisches Verfahren. Demnach umfassen diese Ansprüche einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

- 3). Der Wortlaut des Anspruchs 1 ist unklar: es erfolgt eine sequentiell-parallele Teilung, die gemäß Anspruch 1 jedoch zu einer Auflösung der Gewebeprobe führt?! Zudem scheint der Ausdruck "sequentiell-parallel" in der Fachwelt kein üblicher Begriff zu sein. Das gleiche scheint auch für den Ausdruck "ortsaufgelöst" zu gelten. Demnach führt die Verwendung dieser Begriffe zu Einwänden bezüglich mangelnder Klarheit (Art. 6 PCT). Deshalb sollte dieser Begriff eventuell durch den in der Beschreibung auf Seite 4 verwendeten Begriff "aufgeteilt" ersetzt werden.

18.

EPO-BERLIN

02 -03- 2001

Patentansprüche

5

1.: Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Human-
gewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen,
dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe (6) auf
der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf
Tumorzellen, Normalzellen und Kontaminanten durch ei-
ne sequentiell-parallele Teilung mechanisch in Schei-
bensegmente örtlich aufgelöst wird und die einzelnen
Gewebeprobensegmente separiert und weiter in Gewebe-
fragmente geteilt werden und die gewonnenen kleinen,
separierten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten
der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in ei-
nem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen
Kulturbedingungen bei Unterdrückung des störenden
Einflusses von Normalzellen und Kontaminanten selek-
tiv zum Wachstum gebracht werden.

10

2.: Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und
intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe ge-
wonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe
haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnah-
mestelle der Probe an dem betreffenden Patienten bis
zur Herstellung der Gewebefragmente in ein Zellkul-
turmedium eingebracht wird.

15

20

3.: Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß das Zellkulturmedium zur Aufbewahrung der fri-
schen Gewebeprobe mit dem zur Vermehrung der Tumor-
zellen vorgesehenen Zellkulturmedium identisch ist.

25

30

35

4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten(6a) erzeugten Gewebefragmente und -flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten Zellkulturflaschen unter einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 % und einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 - 5 % sowie bei einer Luftfeuchte von 100 % und Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.

10 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturflasche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.

15 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, wie Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.

8. Zellkulturmedium zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es aus anorganischen Salzen, nämlich

5	Ca(NO ₃) ₂	10-100	mg/L
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	80-150	mg/L
	KCl	200-1000	mg/L
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	150-700	mg/L
	NaCl	3000-10000	mg/L
10	NaHCO ₃	1500-4000	mg/L
	Na ₂ HPO ₄	100-1000	mg/L;

Aminosäuren, nämlich

15	L-Arginin • 4 HCl	10-500	mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Asparaginsäure	10-500	mg/L
	L-Cystin	10-500	mg/L
20	L-Glutaminsäure	10-500	mg/L
	L-Glutamin	10-500	mg/L
	Glycin	10-500	mg/L
	L-Histidin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Hydroxyprolin	10-500	mg/L
25	L-Isoleucin	10-500	mg/L
	L-Leucin	10-500	mg/L
	L-Lysin • HCL	10-500	mg/L
	L-Methionin	10-500	mg/L
	L-Phenylalanin	10-500	mg/L
30	L-Prolin	10-500	mg/L
	L-Serin	10-500	mg/L
	L-Threonin	10-500	mg/L
	L-Tryptophan	5-400	mg/L
	L-Tyrosin	10-500	mg/L
35	L-Valin	10-500	mg/L
	L-Alanin	10-300	mg/L

Vitaminen, nämlich

	Biotin	0,01-10	mg/L
5	D-Ca-Pantothenat	0,01-10	mg/L
	Cholinchlorid	0,1-50	mg/L
	Folsäure	0,01-10	mg/L
	i-Inositol	0,1-100	mg/L
	Nicotinamid	0,01-10	mg/L
10	Pyridoxal • HCL	0,01-10	mg/L
	Riboflavin	0,1-100	µg/L
	Thiamin • HCL	0,1-50	mg/L
	Para-Aminobenzoesäure	1-1000	µg/L
	Vitamin B ₁₂	1-1000	µg/L
15	Niacin	1-100	µg/L
	Ascorbinsäure	1-5000	µg/L
	Folinsäure	1-100	µg/L
	Liponsäure	1-100	µg/L
	Vitamin A (Acetat)	10-1000	µg/L
20	Pyridoxin • HCl	1-100	µg/L
	Niacinamid	1-100	µg/L
	α-Tocopherolphosphat	0-1000	µg/L

sowie

25	D-Glucose	100-5000	mg/L
	Phenolrot	0,1-1000	mg/L
	Glutathion (reduziert)	0,01-10	mg/L
	Na-Pyruvat	0,1-50	nM
30	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF) -rekombinant	1-3000	ng/L
	Fötales Rinderserum (FBS)		
	Insulin vom Rind (Lyophilisat)	0,1-50	mg/L

35 und Antibiotika zusammengesetzt ist.

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (1a1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1e1 bis 1e10) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) übereinstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.

30

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete aufgerauhte Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

35

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.

5

10. 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10) ist.

15

20

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.

25

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) verspannte Schneiddrähte bilden.

30

35

15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangschale (13) gehalten sind, wobei in den Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

24

16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar
sowie drehbar angeordnet sind.

10



15

20



25

30

35

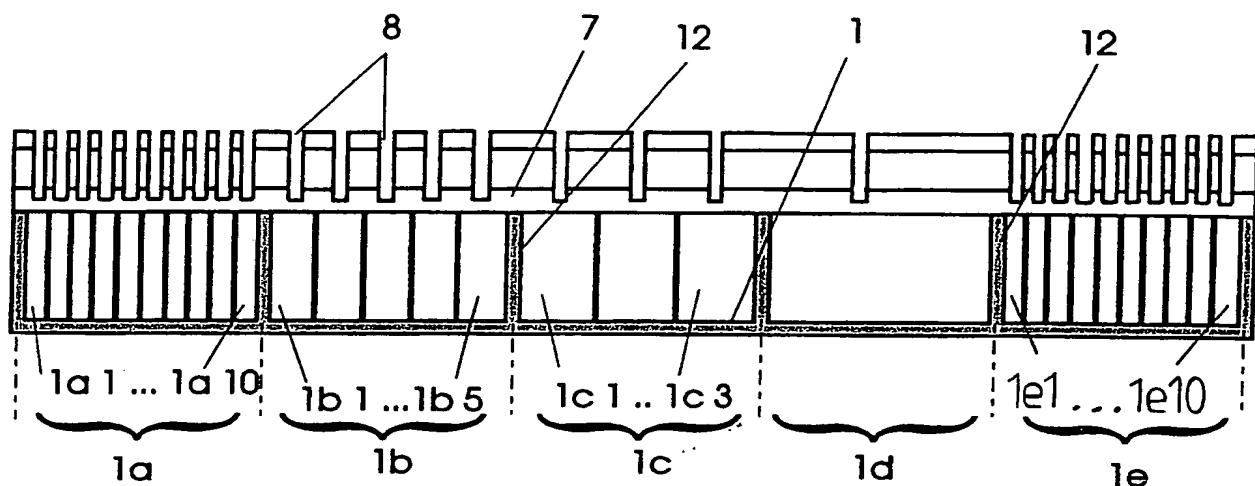


Fig. 3

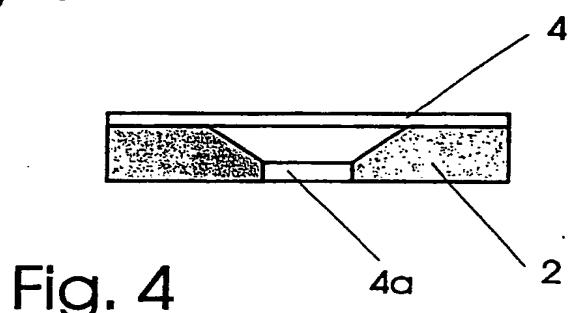


Fig. 4

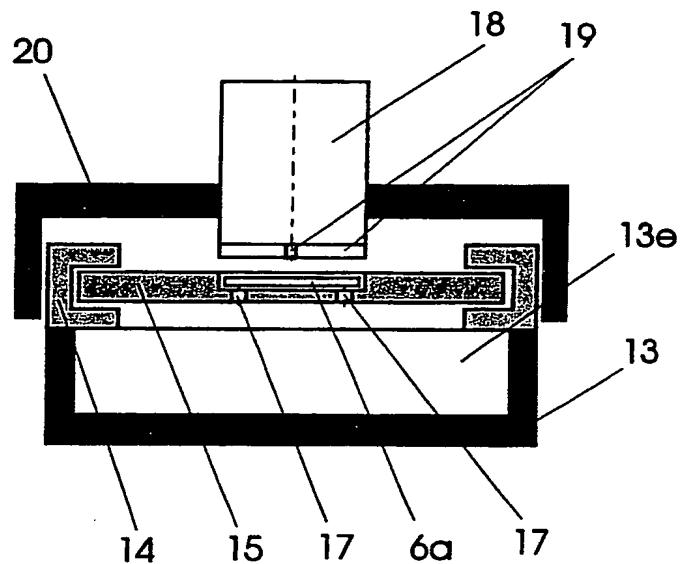


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/DE 00/00528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/08 C12M3/04 G01N1/06 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DE 199 12 798 C (JORDAN ANDREAS) 17 February 2000 (2000-02-17) the whole document —	1-16
A	WO 97 23602 A (NESTLE SA ;BAUR MARKUS (CH); MACE CATHERINE (CH); MALNOE ARMAND (C) 3 July 1997 (1997-07-03) page 15, line 8-31; example 6 — —/—	1,5-8

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28 November 2000

07/12/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/DE 00/00528

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IMAGAWA W ET AL: "SERUM-FREE GROWTH OF NORMAL AND TUMOR MOUSE MAMMARY EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 79, no. 13, 1982, pages 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,5-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26 December 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18 August 1995 (1995-08-18) abstract	9,11
A	WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14 September 1995 (1995-09-14) abstract; figures 1,2	9,11
A	DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13 April 1995 (1995-04-13) claims 1,2; figures 1-3	9
P,X	US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16 November 1999 (1999-11-16) page 5, line 15 -page 6, line 19	1,5-8

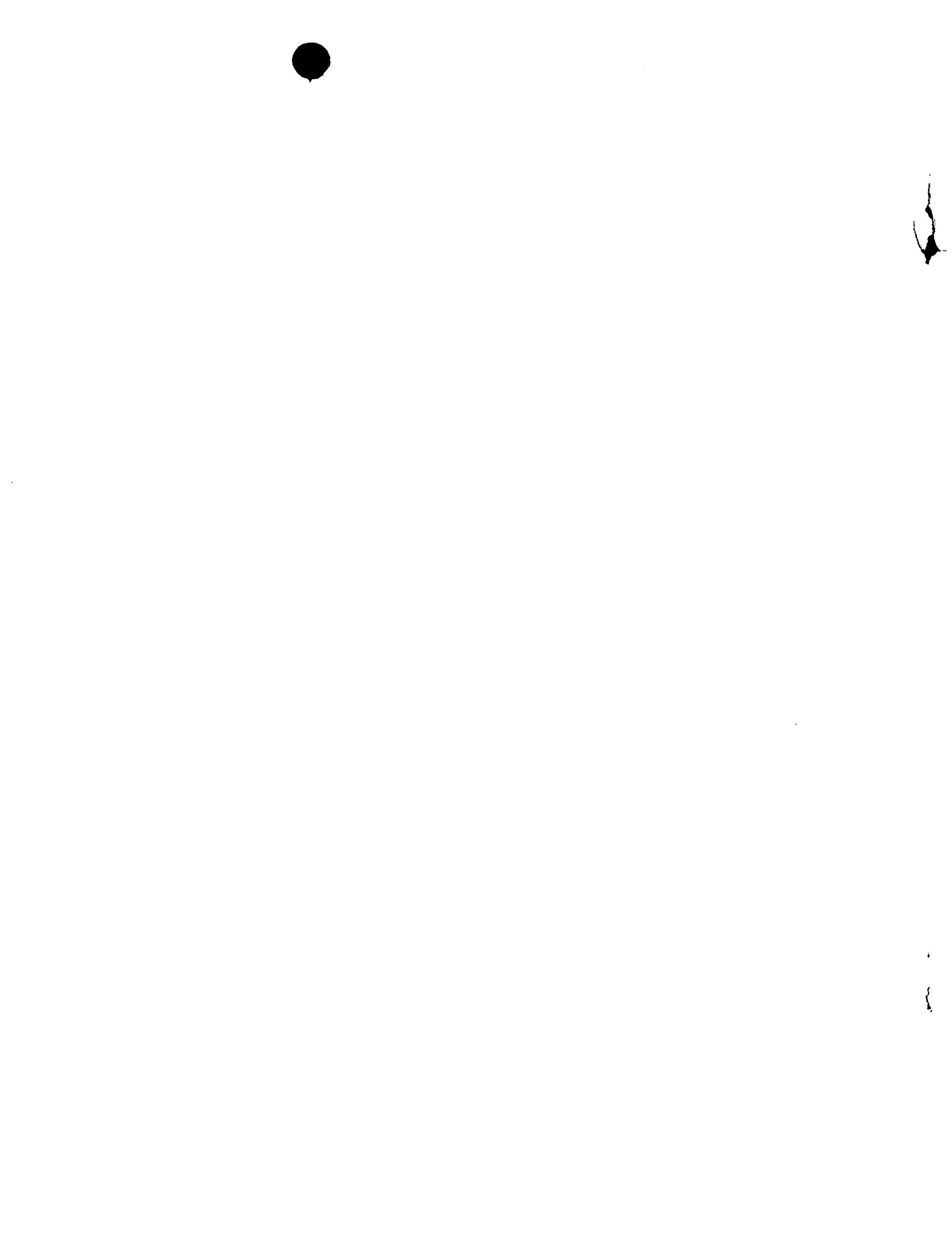
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

at Application No

PCT/DE 00/00528

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19912798	C	17-02-2000	WO	0053728 A	14-09-2000
WO 9723602	A	03-07-1997	AU	1305497 A	17-07-1997
			BR	9612256 A	13-07-1999
			CZ	9801945 A	11-11-1998
			EP	0780469 A	25-06-1997
			EP	0877797 A	18-11-1998
			HU	9903742 A	28-03-2000
			JP	2000506374 T	30-05-2000
			NO	982810 A	21-08-1998
			PL	327320 A	07-12-1998
			SK	83598 A	11-01-1999
JP 07218398	A	18-08-1995	NONE		
WO 9524464	A	14-09-1995	AU	687531 B	26-02-1998
			AU	2060195 A	25-09-1995
			CA	2162465 A	14-09-1995
			EP	0698085 A	28-02-1996
			IL	112944 A	18-02-1997
			JP	9501324 T	10-02-1997
			US	5512480 A	30-04-1996
DE 4334281	A	13-04-1995	AT	186478 T	15-11-1999
			DE	9321578 U	09-03-2000
			EP	0647475 A	12-04-1995
US 5985290	A	16-11-1999	US	6033674 A	07-03-2000
			US	6087174 A	11-07-2000



INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 00/00528

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
 IPK 7 C12N5/08 C12M3/04 G01N1/06 C12N5/06

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	DE 199 12 798 C (JORDAN ANDREAS) 17. Februar 2000 (2000-02-17) das ganze Dokument	1-16
A	WO 97 23602 A (NESTLE SA ;BAUR MARKUS (CH); MACE CATHERINE (CH); MALNOE ARMAND (C) 3. Juli 1997 (1997-07-03) Seite 15, Zeile 8-31; Beispiel 6	1,5-8 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28. November 2000

07/12/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00528

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	IMAGAWA W ET AL: "SERUM-FREE GROWTH OF NORMAL AND TUMOR MOUSE MAMMARY EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 79, Nr. 13, 1982, Seiten 4074-4077, XP000965632 1982 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ---	1,5-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26. Dezember 1995 (1995-12-26) & JP 07 218398 A (SEITAI KAGAKU KENKYUSHO:KK), 18. August 1995 (1995-08-18) Zusammenfassung ---	9,11
A	WO 95 24464 A (BAXTER INT ;UNIV NORTHWESTERN (US)) 14. September 1995 (1995-09-14) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 ---	9,11
A	DE 43 34 281 A (DORNHAN MASCHF GMBH) 13. April 1995 (1995-04-13) Ansprüche 1,2; Abbildungen 1-3 ---	9
P,X	US 5 985 290 A (LEVITSKY HYAM I ET AL) 16. November 1999 (1999-11-16) Seite 5, Zeile 15 -Seite 6, Zeile 19 ---	1,5-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur gleichen Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00528

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19912798	C	17-02-2000	WO	0053728 A		14-09-2000
WO 9723602	A	03-07-1997	AU	1305497 A		17-07-1997
			BR	9612256 A		13-07-1999
			CZ	9801945 A		11-11-1998
			EP	0780469 A		25-06-1997
			EP	0877797 A		18-11-1998
			HU	9903742 A		28-03-2000
			JP	2000506374 T		30-05-2000
			NO	982810 A		21-08-1998
			PL	327320 A		07-12-1998
			SK	83598 A		11-01-1999
JP 07218398	A	18-08-1995		KEINE		
WO 9524464	A	14-09-1995	AU	687531 B		26-02-1998
			AU	2060195 A		25-09-1995
			CA	2162465 A		14-09-1995
			EP	0698085 A		28-02-1996
			IL	112944 A		18-02-1997
			JP	9501324 T		10-02-1997
			US	5512480 A		30-04-1996
DE 4334281	A	13-04-1995	AT	186478 T		15-11-1999
			DE	9321578 U		09-03-2000
			EP	0647475 A		12-04-1995
US 5985290	A	16-11-1999	US	6033674 A		07-03-2000
			US	6087174 A		11-07-2000

1

2